

Studiu experimental preliminar asupra toxicității acute a unor extracte din *Vernonia kotschyana* la șoarece

Preliminary experimental research on acute toxicity of *Vernonia kotschyana* extracts in mice

A. Vasincu¹, Daniela Carmen Ababei¹, Oana Dana Arcan¹, Delia Bulea¹, Monica Neamțu¹, S. Beșchea Chiriac^{*3}, Veronica Bild^{1,2,4}

¹ Disciplina de Farmacodinamie și Farmacie Clinică, U.M.F. „Grigore T. Popa” – Iași

² Centrul de Cercetări Biomedicale, Academia Română, Filiala Iași

³ U.S.A.M.V. „Ion Ionescu de la Brad” Iași

⁴ CEMEX – U.M.F. „Grigore T. Popa” Iași

E-mail: sbeschea@yahoo.com

Cuvinte cheie: *Vernonia kotschyana*, toxicitate acută, șoareci

Key words: *Vernonia kotschyana*, acute toxicity, mice

Rezumat

În medicina tradițională din statul Mali, *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. ex Walp (*Asteraceae*) este folosită în vederea tratării afecțiunilor gastrice și ulcerului gastro-duodenal. Din materialul vegetal, reprezentat de rădăcinile speciei *Vernonia kotschyana* au fost obținute trei extracte: în acetat de etil (V-AE), etanol (V-E) și apă (V-A). Toxicitatea acută a celor trei extracte a fost evaluată pe șoareci *Swiss albino*. Cele trei extracte au fost administrate pe cale orală în doză unică, în următoarea secvență: 800, 1600 și 3200 mg/kg corp. Animalele au fost monitorizate zilnic, timp de 14 zile. Rezultatele experimentale au arătat o modificare semnificativă statistic a consumului de apă după administrarea extractelor V-A și V-E. Pentru extractul V-AE s-a putut determina valoarea DL50 (2021,09 +/- 1484,2 mg/kg corp), pentru secvența de doze studiată, care permite încadrarea extractului în categoria de substanțe cu toxicitate mică. Extractele V-A și V-E nu s-au dovedit a fi toxice pentru secvențele de doze administrate. Datele înregistrate încurajează continuarea cercetărilor asupra materialului vegetal, în ceea ce privește caracterizarea fitochimică a acestuia, cât și evaluarea unor potențiale acțiuni biologice.

Abstract

Vernonia kotschyana Sch. Bip. ex Walp (*Asteraceae*) is used in traditional medicine of Mali to treat gastric diseases and gastro-duodenal ulcer. Three extracts were obtained from vegetal material, represented by roots of *Vernonia kotschyana*: ethyl acetate (V-AE), ethanol (V-E) and water (V-A) extract. The acute toxicity of the three extracts was studied in *Swiss albino* mice. The three extracts were administered orally in single dose in the following sequence: 800, 1600 and 3200 mg/kg body weight. Animals were monitored daily for 14 days. Experimental results showed statistically significant change in water consumption after administration of V-A and V-E extracts. On the studied dose sequence LD50 value could be determined for V-AE extract (2021.09 +/- 1484.2 mg/kg b.w.) that is considered slightly toxic category. V-A and V-E extracts were not found to be toxic on the administered dose sequences. The recorded data encourage further research on vegetal material in terms of phytochemical characterization and the assessment of some potential biological actions.

Introducere

Cu toate progresele făcute în domeniul chimiei de sinteză și semisinteză, plantele rămân totuși o sursă importantă de substanțe cu potențial terapeutic. Cercetările actuale sunt îndreptate spre identificarea de noi

alternative terapeutice la medicația clasică, cu siguranță și eficacitate crescute, precum și cu efecte secundare mai puține.

Vernonia kotschyana Sch. Bip. ex Walp (*Asteraceae*) este o plantă africană, utilizată în medicina tradițională pentru tratamentul mai multor afecțiuni. În Mali, rădăcinile se folosesc

în tratamentul disfuncțiilor digestive (ulcer gastro-duodenal, gastrită, indigestie) și vindecarea rănilor (Austarheim I. *et al.*, 2012; Nergard C.S. *et al.*, 2004).

După spălare, mărunțire și uscare, rădăcinile plantei se pulverizează până la obținerea unei pulberi foarte fine. Aceasta se administrează pacienților fie în stare uscată, fie suspendată în apă caldă, de trei ori pe zi, până la dispariția simptomelor (Inngjerdingen K. *et al.*, 2004; Nergard C.S. *et al.*, 2004).

Cercetătorii din cadrul *Departamentului de Medicină Tradițională* din Mali au efectuat *screening*-ul fitochimic preliminar pe extractul apos obținut din rădăcinile acestei specii. A fost pusă în evidență prezența saponozidelor, taninurilor catehice și galice și polizaharidelor (inulină, pectine, mucilagii) (Germano M.P. *et al.*, 1996; Sanogo R.).

Studiile efectuate asupra diferitelor părți ale plantei au relevat faptul că aceasta are diferite acțiuni biologice: antiulceroasă (Ibrahim G. *et al.*, 2009), de modulare a sistemului imun (Nergard C.S. *et al.*, 2005), analgezică și antiinflamatoare (Ibrahim G. *et al.*, 2009), antibacteriană (activă față de diferite specii de *Salmonella* și *Staphylococcus aureus*) (Ibrahim G., Ogaji Y.N., 2012), larvicidă, antiprotozoarică și moluscicidă, antioxidantă (Diallo D. *et al.*, 2001).

Pentru extractul apos obținut din rădăcinile speciei a fost efectuat un studiu de toxicitate *in vivo*, față de crustacee de apă sărată, *Artemia salina* Leach, utilizând metoda de determinare a concentrației letale 50 (CL₅₀) propusă de Meyer *et al.*, în 1982 (Meyer B.N. *et al.*, 1982). Sanogo *et al.* au stabilit o CL₅₀ superioară valorii prag de 1000 μg/mL (Sanogo R. *et al.*, 1996).

De asemenea, Ibrahim *et al.* au efectuat un studiu de toxicitate acută asupra extractului etanolic din frunzele speciei, administrat pe cale intraperitoneală, la șoareci *Swiss albino*. Ca semne de intoxicație acută, au fost observate apatia și scăderea motilității animalelor (Ibrahim G. *et al.*, 2009).

Obiectivul acestui studiu este investigarea siguranței în utilizare a diferitelor extracte ale plantei, având în vedere că planta este

utilizată în medicina tradițională, prin evaluarea toxicității acute.

1. Material și metodă

Animalele

Studiul de toxicitate acută s-a desfășurat folosind șoareci *Swiss albino*, având greutate cuprinsă între 25,00-35,00 g. Animalele au fost obținute de la Institutul *Cantacuzino*, București. Animalele au fost aclimatizate timp de 10 zile înainte de începerea experimentelor, cu acces liber la hrană standard și apă *ad libitum*.

Animalele au fost găzduite în cuști de polietilenă, în spații bine ventilate, cu temperatura de 21,00 ± 2,00 °C și un ciclu lumină-întuneric de 12,00 h.

Studiul experimental a fost efectuat în concordanță cu regulile internaționale ale privind bioetica studiului pe animale de laborator și cele specifice ale Comisiei de Etică a Cercetării din cadrul Universității de Medicină și Farmacie „Grigore T. Popa” Iași (Directive-UE, 2010).

Material vegetal

Materialul vegetal, reprezentat de rădăcinile speciei *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. ex Walp. a fost furnizat de *Departamentul de Medicină Tradițională*, Bamako, Mali. Identitatea materialului vegetal a fost confirmată de specialiști din același departament. Materialul vegetal, uscat și pulverizat, a fost depozitat la loc uscat și răcoros, ferit de lumină. O mostră din produsul vegetal a fost depozitată la Disciplina de Farmacognozie, Facultatea de Farmacie, Universitatea de Medicină și Farmacie „Grigore T. Popa” Iași.

Obținerea extractelor vegetale

Extractele în acetat de etil (**V-AE**) și etanol (**V-E**) au fost obținute prin metoda extracțiilor succesive, folosind solvenți de polarități diferite, după cum a fost descris anterior (Vasincu A. *et al.*, 2014).

Extractul apos (**V-A**) a fost obținut utilizând o altă metodă de extracție, similară celei folosite în medicina tradițională (infuzare, urmată de macerare prelungită). Toate

extractele au fost depozitate la -20 °C până la utilizare.

Studiul toxicității acute

Șoarecii au fost împărțiți în mod aleator în trei grupe (**V-A**, **V-AE**, **V-E**), corespunzător tipurilor de extract utilizate, fiecare grup conținând la rândul său câte trei loturi cu secvențele de doze administrate. Cu trei ore înainte de experiment, animalelor le-a fost sistată hrana și apa.

Extractele au fost administrate pe cale orală, în suspensie de CMC-Na în doză unică, în următoarea secvență: 800, 1600 și 3200 mg/kg corp. Animalele au fost monitorizate în prima oră, iar observațiile au fost notate după două, patru și șase ore de la administrarea extractelor în primele 24 ore.

Timp de 14 zile animalele s-au verificat următoarele aspecte: letalitate, comportament motor, reacții la stimuli externi, aspectul blăni și cozii, prezența convulsiilor, a tremorului, modificări de tranzit intestinal. Greutatea animalelor, consumul de hrană și apă au fost înregistrate zilnic. În ziua a 15-a, toate animalele au fost sacrificate pentru evaluarea aspectelor histologice (Jung E.-Y. *et al.*, 2010; Traesel G.K. *et al.*, 2014).

Determinarea dozei letale 50 (DL₅₀) pentru calea orală de administrare s-a efectuat prin utilizarea metodei Miller-Tainter (variantea computerizată). Interpretarea datelor a fost de tip cuantal (Miller L.C., Tainter M.C., 1944). Evaluarea consumului de apă, hrană și a greutății corporale a fost realizată folosind testul *t Student* (GraphPad Prism 6).

2. Rezultate și discuții

În urma administrării pe cale orală a suspensiilor din extractele **V-A**, **V-AE** și **V-E**, în dozele menționate la capitolul *Material și metodă*, s-au obținut următoarele date.

Din **Tabelul 1** se observă o modificare a consumului de apă în manieră dependentă de doză. Datele au fost semnificative statistic.

Pe parcursul a 14 zile de experiment consumul de apă a fost fluctuant, cu abateri semnificative de la consumul mediu de apă pe zi. Curba ponderală și consumul de hrană nu au suferit modificări pe parcursul experimentului.

Din **Tabelul 2** reiese o modificare a consumului de apă, însă parametrii statistici nu pun în evidență semnificația consumului. Greutatea corporală și consumul de hrană nu au înregistrat modificări.

Din **Tabelul 3** reiese o modificare a consumului de apă comparativ. Parametrii statistici pun în evidență semnificația acestor date. Curba ponderală și consumul de hrană nu au înregistrat modificări.

Din **Tabelul 4** se poate observa că pentru extractul **V-AE** s-a putut determina valoare DL₅₀ pentru secvența de doze studiată. Aceasta permite încadrarea extractului **V-AE** în categoria de substanțe cu toxicitate mică, conform scalei de toxicitate Hodge-Sterner (Ahmed M., 2015). Extractele **V-A** și **V-E** nu s-au dovedit a fi toxice pentru secvențele de doze administrate.

Tabelul 1.

Evaluarea greutății corporale, a comportamentului alimentar și a consumului de apă după administrarea extractului VA

Nr. crt.	Substanță administrată	Parametru	Media / animal Z1	Media / Lot Z14	Media / animal Z14	Parametri statistici (consum de apă)
Lot 1	Extract V-A 800 mg/kg corp	Greutate m.c. (g) / lot	39,66	115,92	38,64	Valoarea P 0,0040 Media ± SEM coloana A 3,003 ± 0,3317, n=3
		Consum hrană (g) / lot	4,00	17,85	5,95	
		Consum apă (mL) / lot	3,33	45,00	15,00	
Lot 2	Extract V-A 1600 mg/kg corp	Greutate m.c. (g) / lot	39	92,71	37,88	Media ± SEM coloana B 12,23 ± 1,518, n=3 Diferența între medii 9,227 ± 1,554
		Consum hrană (g) / lot	6,34	14,28	5,71	
		Consum apă (mL) / lot	3,34	29,82	11,92	
Lot 3	Extract V-A 3200 mg/kg corp	Greutate m.c. (g) / lot	34	105,42	35,14	95% interval de încredere 4,913 ↔ 13,54 t=5,939, df=4 * SEM, Eroarea standard a mediei
		Consum hrană (g) / lot	6	16,07	5,35	
		Consum apă (mL) / lot	2,34	29,32	9,77	

Tabelul 2.

Evaluarea greutății corporale, a comportamentului alimentar și a consumului de apă după administrarea extractului V-AE

Nr. crt.	Substanță administrată	Parametru	Media / animal Z1	Media / lot Z14	Media / animal Z14	Parametri statistici (consum de apă)
Lot 1	Extract V-AE 800 mg/kg corp	Greutate m.c. (g) / lot	37,00	109,05	37,40	Valoarea P 0,1578 Media ± SEM coloana A 7,223 ± 2,001, n=3 Media ± SEM coloana B 10,76 ± 0,3824, n=3 Diferența între medii 3,533 ± 2,037 95% interval de încredere -2,122 ↔ 9,188 t=1,735 df=4
		Consum hrană (g) / lot	6,34	17,14	5,85	
		Consum apă (mL) / lot	3,34	29,82	10,18	
Lot 2	Extract V-AE 1600 mg/kg corp	Greutate m.c. (g) / lot	34	106,00	35,33	10,76 ± 0,3824, n=3 Diferența între medii 3,533 ± 2,037 95% interval de încredere -2,122 ↔ 9,188 t=1,735 df=4
		Consum hrană (g) / lot	6,00	17,92	5,97	
		Consum apă (mL) / lot	10	34,46	11,48	
Lot 3	Extract V-AE 3200 mg/kg corp	Greutate m.c. (g) / lot	32,33	47,82	22,11	* SEM, Eroarea standard a mediei
		Consum hrană (g) / lot	5,00	6,57	4,18	
		Consum apă (mL) / lot	8,33	16,64	10,61	

Tabelul 3.

Evaluarea greutății corporale, a comportamentului alimentar și a consumului de apă după administrarea extractului V-E

Nr. crt.	Substanță administrată	Parametru	Media / animal Z1	Media / lot Z14	Media / animal Z14	Parametri statistici (consumul de apă)
Lot 1	Extract V-E 800 mg/kg corp	Greutate m.c. (g) / lot	37,33	112,25	37,41	Valoarea P 0,0032 Media ± SEM coloana A 2,78 ± 0,56, n=3 Media ± SEM coloana B 12,32 ± 1,394, n=3 Diferența între medii 9,54 ± 1,503 95% interval de încredere 5,368 ↔ 13,71 t=6,349 df=4
		Consum hrană (g) / lot	6,66	22,14	7,38	
		Consum apă (mL) / lot	3,34	44,42	14,82	
Lot 2	Extract V-E 1600 mg/kg corp	Greutate m.c. (g) / lot	35,00	112,28	37,42	* SEM, Eroarea standard a mediei
		Consum hrană (g) / lot	7,33	16,92	5,64	
		Consum apă (mL) / lot	1,66	30,00	10,00	
Lot 3	Extract V-E 3200 mg/kg corp	Greutate m.c. (g) / lot	31,00	110,92	36,97	* SEM, Eroarea standard a mediei
		Consum hrană (g) / lot	9,00	20,5	6,83	
		Consum apă (mL) / lot	3,34	36,42	12,14	

Tabelul 4.

Determinarea valorii DL50 pentru extractele V-A, V-AE, V-E, în vederea evaluării toxicității acute

Nr. crt.	Substanță administrată	Mortalitate	Valoare DL50 (mg/kg)
1	Extract V-A	1/9	n/a
2	Extract V-AE	2/9	2021,09 +/- 1484,2 Y = 0,246 + 1,438*X
3	Extract V-E	0/9	n/a

3. Concluzii

Având în vedere potențiala acțiune antiulceroasă și analgezică a plantei, descrisă în literatura de specialitate, am inițiat un studiu preliminar, în vederea evaluării toxicității acute și a determinării valorii DL₅₀ pentru extractele obținute.

Demonstrarea valorii DL₅₀ pentru extractul **V-AE**, la care se adaugă evaluarea consumului de apă, hrană și a greutateii corporale permit continuarea studiului pentru cercetări avansate.

Modificarea semnificativă a consumului de apă pentru extractele **V-A** și **V-E** demonstrată în acest experiment, nu poate fi deocamdată explicată.

Datele înregistrate încurajează continuarea cercetărilor asupra materialului vegetal, în ceea ce privește caracterizarea fitochimică a acestuia, cât și evaluarea unor potențiale acțiuni biologice.

Mulțumiri

Cercetare științifică finanțată de Universitatea de Medicină și Farmacie „Grigore T. Popa” Iași, în baza contractului nr. 29029 / 28.12.2016.

Bibliografie

- Ahmed M.** (2015). "Acute Toxicity (Lethal Dose 50 Calculation) of Herbal Drug Somina in Rats and Mice." *Pharmacology & Pharmacy* **6**: 185-189.
- Austarheim I, Nergard CS, Sanogo R, Diallo D, Paulsen BS** (2012). "Inulin-rich fractions from Vernonia kotschyana roots have anti-ulcer activity." *Journal of Ethnopharmacology* **144**[1]: 82-85.
- Diallo D, Marston A, Terreaux C, Toure Y, Paulsen BS, Hostettmann K** (2001).. "Screening of Malian Medicinal Plants for Antifungal, Larvicidal, Molluscicidal, Antioxidant and Radical Scavenging Activities." *PHYTOTHERAPY RESEARCH* **15**: 401-406.
- Directive-UE** (2010). Directive 2010/63/UE du Parlement Européen et du Conseil du 22 septembre 2010, relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, *Journal officiel de l'Union européenne*.
- Germano MP, De Pasquale R, Iauk L, Galati EM, Keita A, Sanogo R** (1996). "Antiulcer activity of Vernonia kotschyana sch. bip." *Phytomedicine* **2**[3]: 229-233.
- Ibrahim G, Abdurahman EM, Ibrahim H, Ibrahim NDG, Yaro AH.** (2009). "STUDIES ON Acute toxicity and anti-inflammatory effects of Vernonia kotschyana Sch. BIP. (Asteraceae) ethanol leaf extract." *Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences* **8**[2]: 8-12.
- Ibrahim G, Ogaji YN** (2012). "Crude flavonoids from Vernonia kotschyana possess antimicrobial activity." *Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences* **11**[2]: 41-49.
- Inngjerdigen K, Nergård CS, Diallo D, Mounkoro PP, Paulsen BS** (2004). "An ethnopharmacological survey of plants used for wound healing in Dogonland, Mali, West Africa." *Journal of Ethnopharmacology* **92**[2-3]: 233-244.
- Jung E-Y, Lee H-S, Chang UJ, Bae SH, Kwon KH, Suh HJ** (2010). "Acute and subacute toxicity of yeast hydrolysate from Saccharomyces cerevisiae." *Food and Chemical Toxicology* **48**[6]: 1677-1681.
- Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL** (1982). "Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents." *Planta Medica* **45**[5]: 31-34.
- Miller LC, Tainter MC** (1944). "Estimation of the LD50 and its errors by means of logarithmic-probit graph paper." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **57**[2]: 261-264.
- Nergard CS, Diallo D, Michaelsen TE, Malterud KE, Kiyohara H, Matsumoto T, Yamada H, Paulsen BS** (2004). "Isolation, partial characterisation and immunomodulating activities of polysaccharides from Vernonia kotschyana Sch. Bip. ex Walp." *Journal of Ethnopharmacology* **91**[1]: 141-152.
- Nergard CS, Kiyohara H, Reynolds JC, Thomas-Oates JE, Matsumoto T, Yamada H, Michaelsen TE, Diallo D, Paulsen BS** (2005). "Structure-immunomodulating activity relationships of a pectic arabinogalactan from Vernonia kotschyana

- Sch. Bip. ex Walp." *Carbohydrate Research* **340**[11]: 1789-1801.
14. **Sanogo R** (2002). Formulation d'un médicament traditionnel amélioré à base de poudre des racines de *Vernonia kotschyana*. *Journées Pharmaceutiques Internationales de Paris*, Faculté de Pharmacie, Paris, Département Médecine Traditionnelle.
 15. **Sanogo R, De Pasquale R, Iauk L, De Tommasi N, Germano MP** (1996). "Vernonia kotschyana Sch. Bip.: Tolerability and gastroprotective activity." *Phytotherapy Research* **10**[1]: S169-S171.
 16. **Traesel GK, de Souza JC, de Barros AL, Souza MA, Schmitz WO, Muzzi RM, Oesterreich SA, Arena AC** (2014). "Acute and subacute (28 days) oral toxicity assessment of the oil extracted from *Acrocomia aculeata* pulp in rats." *Food and Chemical Toxicology* **74**: 320-325.
 17. **Vasincu A, Paulsen BS, Diallo D, Vasincu I, Aprotosoiaie AC, Bild V, Charalambous C, Constantinou AI, Miron A, Gavrilescu CM** (2014). "Vernonia kotschyana Roots: Therapeutic Potential via Antioxidant Activity." *Molecules* **19**: 19114-19136.